

1.1.2.Laboratuvarda Kullanılan Cihazlar



1.Mikroskop: Gözle görülemeyecek kadar küçük olan nesnelere görmemizi sağlayan mikroskop laboratuvarlarımızın başlıca cihazlarından biridir. Mikroskop ile ilgili detaylı bilgi uygulama 2 bölümünde anlatılmıştır



2. pH Metre: Sulu çözeltilerdeki H^+ ve OH^- konsantrasyonlarını logaritmik olarak ifade eden, pH değeri ölçen laboratuvar cihazıdır. pH bir maddenin asitlik bazlık (alkalinlik)derecesini ifade eder.



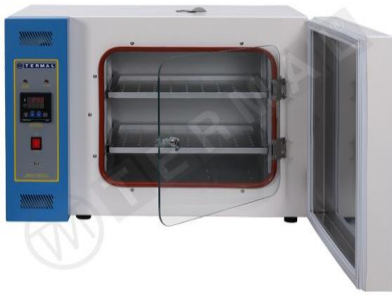
3.Santrifüj: Merkez kaç kuvveti prensibine göre çalışan santrifüj, farklı yoğunluklara sahip olan katı ve sıvı maddelerin yoğunluklarına göre birbirinden ayrılmasını sağlayan laboratuvar cihazıdır. Karışımdaki katı maddeleri sıvı olan kısımdan ayırırken çökelme prensibini kullanır. Santrifüj kullanılırken öncelikle ayrışmasını istediğimiz maddeler santrifüj tüplerinin içerisine eşit miktarda konular daha sonra bu tüpler dengeyi sağlamak adına simetrik bir şekilde cihaza yerleştirilir. Tüpler simetrik olarak yerleştirmedeği takdirde cihaz çalışırken titreşim olur ve santrifüj tüplerinin içerisindeki sıvılar dökülüp cihaza zarar verebilir. Son aşamada ise cihazın hızı, santrifüj işleminin dakikası ve sıcaklığı ayarlanır ve cihaz çalıştırılır.



4.Vorteks: Küçük tüpler içerisindeki az miktarda sıvının girdap oluşturacak bir şekilde homojen karışmasını sağlayan cihazdır. Sabit bir mil üzerinde dönen tek bir döner başlığa sahip olup, döner başlığın kapatılması ile otomatik olarak çalışır.



5. Su Banyosu: Tüp, erlen ve beher benzeri kaplar içerisindeki maddelerin istenilen ısıda belirli bir süre boyunca tutulmasına, donmuş maddelerin çözünmesine veya inkübasyon işleminde kullanılan cihazdır. Zaman ve ısı ayarlı olan bu alet elektrik veya hava gazıyla ısıtılır.



6. Etüv: İnkübatör ve kuru hava sterilizatörü anlamına da gelen etüv, sıcaklığı ayarlanabilen kabin içinde belirli bir sıcaklık elde edilerek kurutma, mikrop üretme, dezenfekte, sterilizasyon, doku ve hücre kültürü çalışmaları gibi amaçlarla kullanılan, dış ortamdan iyi izole edilmiş bir cihazdır.



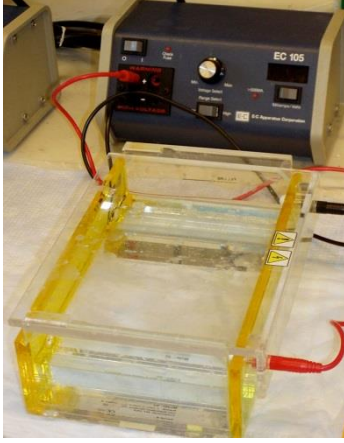
7. Hassas Terazi: laboratuvar ortamlarında ve endüstriyel sektörlerde sıkça kullanılan çok hassas ve küçük ölçüm birimlerinde tartım gerçekleştirebilen tartım cihazıdır. Bir çözelti hazırlarken veya bir maddeden istenilen ölçüde tartım yaparken kullanılan bu teraziler gram ve miligram düzeyindeki ağırlıkları ölçmede oldukça yüksek hassasiyete sahiptir.



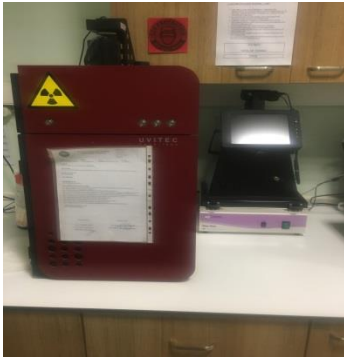
8. Laminar Flow Kabin: Biyolojik açıdan tehlikeli olmayan malzemeler üzerindeki araştırmalar, ilaç hazırlama, besiyeri plakası hazırlama, mikroorganizma ekimi, hücre ve doku kültürü araştırmaları, sitogenetik, moleküler genetik, DNA/RNA izolasyonu ve DNA/RNA ile ilgili çalışmalar, steril teçhizat ve elektronik cihaz montajı gibi steril ortamda çalışılması istenilen birçok çalışmada kullanılır. İçi steril, UV ışınları bulunan kapalı ve ya yarı açık çalışılabilen içerisinde hava sirkülasyonunda olduğu güvenlik kabinleridir. Yatay Laminar Flow kabin ve Dikey Laminar Flow kabin gibi çeşitleri vardır. Yatay Laminar flow kabin havayı bir filtreden geçirerek filtrelenmiş havayı çalışma yüzeyine ve kullanıcıya doğru yatay olarak sabit bir hızda yönlendirir. Dikey Laminar Flow kabin havayı kabinin üzerinde duran bir HEPA filtreden geçirerek filtrelenmiş havayı dikey açıyla aşağı doğru çalışma yüzeyine yönlendirir. Yatay Laminar flow kabin, Dikey kabine göre daha geniş bir çalışma alanı sağlar ve daha yüksektir



9. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Cihazı: DNA 'nın belirli bir bölgesinin primer denilen sentetik oligonükleotid diziler yardımıyla, Polimeraz Zincir Reaksiyonu yoluyla çoğaltılması işleminde kullanılan cihazdır. Denatürasyon, primer bağlanması (Annealing) ve yeni zincir sentezi (Polimerizasyon) olmak üzere 3 aşaması vardır. Cihaz içerisinde Pcr tüplerinin yerleştirileceği kuyucuklar bulunup aynı zamanda döngü basamakları, sıcaklık ve zaman ayarlamaları da istenilen şekilde yapılabilmektedir.



10. Jel Elektroforezi: Saflaştırılmış nükleik asit ve proteinlerin moleküler ağırlığı, miktarı ve alt tiplerinin saptanmasında kullanılan moleküler inceleme yöntemine denir. Agaroz jel elektroforezi ve poliakrilamid jel elektroforezi gibi çeşitleri vardır. Elektroforez, elektriksel bir alanda, anot(+) ve katod(-) uçlarla belirlenmiş bölgelerde, ortamda çözülmüş moleküllerin elektrik yüklerine göre göç etmeleri prensibine dayanır. Molekülün ağırlığı jel üzerindeki yürüme hızını etkilemektedir. DNA ve RNA molekülleri serbest fosfat grubu içerdiği için eksi yüklü moleküllerdir bu nedenle jel elektroforezinde eksi kutuptan (katoddan), artı (anota) doğru hareket eder.



11. Jel Görüntüleme Sistemleri (UV Transilluminatör): beyaz ışık ve ultraviyole ışığı altında agaroz veya poliakrilamid jel elektroforezi sonrası nükleik asitlerin ve proteinlerin görüntülenmesi, miktar ve büyüklük tayini, optik dansitesi belirlememizi sağlayan cihazdır. Aynı zamanda bakteri kolonilerinin de sayılmasına imkan sağlar. Cihazdaki görüntü bir kamera aracılığı ile bilgisayara aktarılır ve görüntü bazı programlar ile analiz edilmektedir.

11.Buzdolabı: Çalışmalarda kullanılacak malzemelerin istenilen derecelerde muhafaza edilmesini sağlar. Gerekli durumlarda derin dondurucular da kullanılır.

Uygulama 5.1: Kandan DNA İzolasyonu

Canlı hücrelerde tüm özelliklerin kuşaktan kuşağa aktarılması genler aracılığı ile olur. Genler, kromozom üzerinde lokalize olmuş bir veya daha fazla nükleotidden oluşan parçacıklardır. Hücrelerdeki genetik, fizyolojik, biyokimyasal vb. olayların tamamını yöneten, genetik bilginin kuşaktan kuşağa aktarılmasını sağlayan DNA molekülüdür. Deoksiribonükleik asit olarak adlandırılan DNA molekülü, 5 karbonlu şeker, bir fosfat grubu ve pürin veya pirimidin olarak adlandırılan organik bazların birleşiminden oluşan, nükleotidlerden meydana gelir. Pürinler, Adenin (A) ve Guanin (G) ; primidinler ise Sitozin (C) ve Timin (T) bazlarıdır. Bazların bağlanması özgün olup her zaman bir pürin bir primidinle eşleşir. Bu eşleşmede daima Adenin(A) Timinle(T), Guanin(G) ise Sitozin(C) ile eşleşmektedir. DNA hücre içerisinde serbest halde bulunmamakla birlikte, büyük bir kısmı çekirdekte, bir kısmı ise mitokondride bulunmaktadır. Bitki hücrelerinde ise DNA kloroplastta bulunur.

Deneyin amacı: Kandan DNA elde etmek

Gereçler: Santrifüj, etüv, vorteks, steril tüp, ependorf tüpü, pipet, kurutma kağıdı, buz kalıpları, lizis tamponu, bidistile H₂O, SDS, proteinaz-K, NaCl, kloroform/izoamil alkol, etil alkol

Metod: 10 ml'lik steril bir tüpe 1 ml 5X lizis tamponu, üzerine 3 ml bidistile H₂O konup pipetle homojen hale getirdikten sonra bu karışıma 1 ml EDTA' lı tam kan ilave ederek tüpün kapağını kapatınız ve alt-üst ederek homojen karışım elde ediniz. Karışımı buz içinde 10 dk inkübe ediniz. Sonrasında +4⁰C'de 4000 rpm' de santrifüj ediniz ve üst sıvıyı uzaklaştırınız. Dipte kalan çözelti üzerine 2 ml bidistile H₂O ve 0.5 ml 5X lizis tamponu koyunuz ve pipetleme yaparak tüpün dibindeki çökeltiyi tamamen dağıtarak homojen arışım elde ediniz. Sonrasında +4⁰C'de 4000 rpm' de 10 dk santrifüj ediniz ve üst sıvıyı uzaklaştırınız. Çökelti üzerine 1ml %10 SDS ve 20 mg/ml' lik proteinaz-K' dan 2.5 µl koyup köpük oluşturmadan iyice pipetleme yaparak çözeltiyi tamamen dağıttınız. Bu çözeltiyi 65⁰C' ye ayarlı etüvde arada bir hafifçe karıştırarak 15 dk inkübe ediniz. Karışım 10 ml'lik tüpten 2 ml 'lik ependorf tüpe aktarılarak buz içinde 5 dk inkübe ediniz. Bu süre sonunda 300 µl sature (6 N) NaCl ilave ettikten sonra tüp bir vorteks yardımıyla iyice çalkalayarak beyaz görümlü içeriği homojen hale getiriniz. Buz içinde 5 dk bekletiniz ve sonra +4 ⁰C'de 13.000 rpm' de 10 dk santrifüj ediniz. Üst sıvıyı 2 ml'lik steril bir ependorf tüpe aktarınız. Bu tüpe 0.5 ml, 24:1 kloroform/izoamil alkol karışımı koyunuz ve tüpü iyice çalkalayarak karışımı homojen hale getiriniz. Bu işlem sonrasında tekrardan +4 ⁰C' de 13.000 rpm' de 2 dk santrifüj ediniz.

Santrifüj sonrası üst sıvıyı dikkatli bir şekilde 2 ml' lik steril bir ependorf tüpe aktarınız. Tüpe 1 ml %99.5' lik etil alkol koyarak tüpü 8-10 kez yavaşça baş-aşağı çevirip DNA' nın presipite olması sağlayınız. Bu aşamada DNA yumak şeklinde görülecektir. +4 °C' de 13.000 rpm' de 10 dk santrifüj ettikten sonra presipite olmuş DNA çöktürülmüş olur. Daha sonra tüpü ters çevirerek alkolü uzaklaştırınız. Tüpe 1 ml %70 etil alkol koyunuz ve tüpü alt-üst ediniz son olarak +4 0C'de 13.000 rpm' de 5 dk santrifüj ediniz sonra tüpü ters çevirerek alkolü uzaklaştırınız. Tüpün ağzı baş aşağı gelecek şekilde bir kurutma kağıdı üzerine koyarak alkolün tamamen uzaklaşması için 15 dk. bekletiniz. Tüpe 200 µl steril bidistile H₂O koyunuz ve DNA'nın tamamen çözünmesi ve DNaz aktivitesinin ortadan kaldırılması için 75 °C'de 10 dk bekletiniz. Böylelikle DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş olur.

Sonuç ve yorumlar:

Çizim:

Uygulama 6: Nükleik Asit Analiz Yöntemleri

Uygulama 6.1. Nükleik Asitlerin Spektrofotometrik Yöntemle Kantitasyonu

Deneyin Amacı: Nükleik Asitlerin Spektrofotometrik Yöntemle saflık ve konsantrasyonun belirlenmesi

Gereçler: Spektrofotometre, pipet, steril bidistile H₂O, quartz tüp, DNA

Metod: DNA izolasyonu tamamlandıktan sonra DNA'nın mikrogram ve nanogram cinsinden miktarını belirlemede spektrofotometrik yöntemler kullanılmaktadır. Absorbsiyon temelli olan bu yöntemde, izole edilen DNA'nın konsantrasyonunun belirlemek için ışığın çözelti içerisindeki iletirme oranı kullanılır. Konsantrasyon ölçümü için ml hacimli iki adet quartz tüp alınız. Bunlardan blank olarak kullanılacak tüpe 1000 µl, ikinci tüpe ise 990 µl steril bidistile H₂O koyunuz. İkinci tüpe elde edilen genomik DNA 'dan 10 µl koyup iyice pipetleme yapınız ve homojen hale getiriniz. Her iki tüpüde spektrofotometre de sırasıyla 260 ve 280 nm dalga boyunda ayrı ayrı okuduktan sonra DNA konsantrasyonunu ve DNA saflığını aşağıdaki formülle hesaplayınız.

DNA konsantrasyonu hesaplaması:

DNA konsantrasyonu = Absorbans (ABS)₂₆₀ * Sulandırma Katsayısı* (50/1000)

Örneğin: 260 absorbans değerini spektrofotometrede 0.09 okudunuz. Bu durumda konsantrasyon hesaplaması şu şekilde olacaktır:

DNA konsantrasyonu= 0.09*100*50/1000= 0.45 µg/µl (450 ng/ µl)

DNA saflığının ölçülmesi:

DNA saflığı= Absorbans (ABS)₂₆₀/ Absorbans (ABS)₂₈₀ şeklinde hesaplaması yapılır.

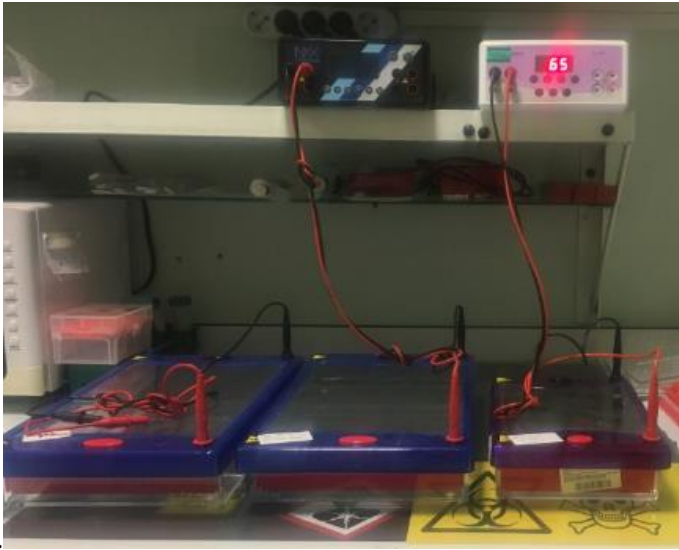
DNA saflığı ((ABS)₂₆₀/ (ABS)₂₈₀) 1.8 – 2.0 aralığında bir değer olmalıdır. Bu aralığın dışında olan DNA saflıkları çalışmalar için net sonuç elde etmemizi zorlaştırır. Örneğin bu oran 1.5 in altında çıkarsa protein fazlalığından dolayı, 2.0' in üzerinde çıkarsa RNA fazlalığından dolayı PCR çalışmalarında problem teşkil edecektir.

Uygulama 6.2. Jel Elektroforez Yöntemi

Deneyin Amacı: PCR ürünlerinin agaroz jel elektrofrezinde incelenmesi

Gereçler: Isıtıcı, Elektroforez sistemi, Erlenmayer, agaroz, TBE, ethidiumbromid, DNA markır, PCR ürünü

Metod: 2.1 g agaroz tartarak 250 ml'lik bir erlenmayere koyun ve 140 ml 1X TBE tamponu ekleyip (%1.5 lik agaroz) ve 25 mg/ml'lik ethidiumbromid'den 4 µl ilave ediniz. Hotplate (ısıtıcı) üzerinde kaynatınız. Yaklaşık 60 °C'ye kadar soğutulan agaroz jeli, jel kabına döküp donması için oda sıcaklığında 30 dk bekletiniz. Elektroforez tarakları jel dökme kabına, tabanda 1mm boşluk kalacak şekilde ayarlanarak yerleştiriniz. Jel donduktan sonra tarakları dikkatlice çıkartarak jel kabı elektroforez tankına yerleştiriniz. Jeldeki açılmış olan kuyucuklara 10'ar µl miktarlarda sırasıyla DNA marker (pUC19/Mspl) ve PCR ürünleri aplike ediniz. Jele elektrik akımı (60 Volt/cm) vererek 15 dk. elektroforez yapınız. Oluşan bantları jel görüntüleme sisteminde inceleyiniz Agaroz jel elektrofrez tankları ve güç kaynakları aşağıdaki resimde gösterilmektedir.



Sonuç ve yorumlar:

Çizim:

Uygulama 7: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Deneyin Amacı: Polimeraz Zincir Reaksiyon karışımı hazırlama, PCR Cihazını kullanma

Gereçler ve Metod : Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) için gerekli olan malzemeler, kullanılacak miktarlar ve final konsantrasyonları aşağıdaki tabloda verilmiştir. Bu tablo sadece bir örnek için olup örnek sayınıza göre uygulama yapabilirsiniz.

Reaksiyon Karışımı	Kullanılacak Miktar(μ l)	Final Konsantrasyon
10X PCR Buffer(S)	2.5	1X
Forward Primer(5pmol/ μ l)	1	5pmol
Reverse Primer(5pmol/ μ l)	1	5pmol
MgCl ₂ (50mM)	1.5	1.5mM
DeoksiNTPs (25 mM)	0.5	0.25mM
Genomik DNA (50 ng/ μ l)	1	50ng
Taq DNA polimeraz (5 U/ μ l)	0.2	1U
Steril bidistile su	17.3	
Toplam Hacim	25 μ l	

Tablo1: PCR reaksiyon karışımı

PCR karışımı Laminar Flow Kabinde hazırlanacaktır. Gerekli olan diğer malzemeler ise otomatik pipet, mikropipet, pipet uçları, buz aküsü, vorteks, steril tüp, ependorf tüpüdür. Kabinde çalışma yaparken herhangi bir kontaminasyon tehlikesiyle karşılaşmamak için kabini kullanmadan önce ve kullandıktan sonra %70' lik etik alkol ile temizleyiniz. Kabin içerisinde açılmış, kullanılmış ve etiketi bulunmayan hiçbir maddeyi kullanmayınız. Kullanılan malzemelerin steril olduğundan emin olunuz. Çalışmaya başlamadan önce mutlaka ellerinizi yıkayıp steril çalışma eldiveni takınız.

PCR karışımını hazırladıktan sonra iyice vorteks yapıp, PCR'ınızı aşağıda verilen amplifikasyon sıcaklık ve sürelerine göre ayarlayınız ve cihazı çalıştırınız. PCR sonucunu yorumlamak için Agaroz Jel Elektrofrezine yükleme yapınız. PCR cihazı, programı ve hazırlanıp PCR' a yüklenen karışımlar aşağıda fotoğrafta gösterilmiştir.

Reaksiyon Aşaması	İlk Denatürasyon	Denatürasyon	Primer Bağlanması (Annealing)	Zincir Uzaması (Extension)	Son Uzatma (final extension)
Döngü Sayısı	(1 defa)	(24 defa)			(1 defa)
Sıcaklık	94.0 °C	94.0 °C	68.0 °C	72:0°C	72.0 °C
Süre	7:00dk	0:30dk	0:40dk	0:50dk	5:00dk

Tablo 2: PCR programı



Sonuç ve yorumlar:

Çizim: